

Aus der Dermatologischen Klinik
der Freien Universität Berlin im Klinikum Steglitz

Strukturelle Veränderungen der Horn- schicht nach experimenteller Irritation der Hautoberfläche

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Johanna Rothenfußer

geb. 22. 5. 1947 in Pöcking

1976

Aus der Dermatologischen Klinik
der Freien Universität Berlin im Klinikum Steglitz

Strukturelle Veränderungen der Horn- schicht nach experimenteller Irritation der Hautoberfläche

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Johanna Rothenfußer

geb. 22. 5. 1947 in Pöcking

Referent : Professor Dr. F. Klaschka
Koreferent : Professor Dr. G. Stüttgen



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fachbereiche der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 20. Februar 1976

I N H A L T

	Seite
1. Einleitung	1
2. Eigene Untersuchungen	4
2.1 Material und Methode	4
2.1.1 Versuchstier	4
2.1.2 Irritation	4
2.1.3 Prüfregion	4
2.1.4 Irritationsmodus	4
2.1.5 Histologische Aufarbeitung	5
2.1.5.1 Färbetechnik	6
2.1.5.2 Zubereitung der Lösung	6
2.1.5.3 Beurteilung	7
2.2 Kriterien der Beurteilung	7
2.2.1 Makroskopische Kriterien	7
2.2.2 Mikroskopische Kriterien	8
3. Ergebnisse	17
3.1 Versuchsgruppe 1	17
3.1.1 Makroskopische Befunde	17
3.1.2 Mikroskopische Befunde	17
3.2 Versuchsgruppe 2	24
3.2.1 Makroskopische Befunde	24
3.2.2 Mikroskopische Befunde	24
3.3 Vergleich der Ergebnisse von Gruppe 1 und 2	35
4. Diskussion	36
4.1 Kritik der Methoden	36
4.2 Erörterung der Befunde	38
5. Zusammenfassung	42
6. Literatur	44

Digitized by the Internet Archive
in 2026

1. Einleitung

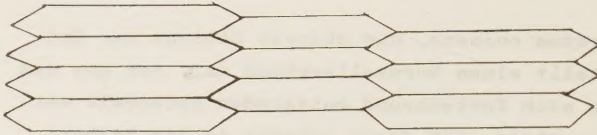
Das Stratum corneum, die oberste Schicht der Epidermis, stellt einen Hornzellverband dar, der aus den Zellen der sich fortwährend mausernden Epidermis entsteht, wenn diese sich durch "Sprung in die Verhornung" (17) geradezu schlagartig in biologisch tote, jedoch in sich fest verbundene Zellplatten umwandelt. In seiner Feinstruktur läßt das Stratum corneum proximal eine pars coniuncta aus festgefügtten Hornzellschichten und eine pars disiuncta, das sogenannte Vorfeld erkennen.

Die pars coniuncta besteht, wie Substanzanalysen der Hornschicht ergaben, etwa zur Hälfte aus Skleroproteinen und zu etwa 40% aus wasserlöslichen Proteinen. Außerdem enthält sie $\frac{2}{3}$ bis $\frac{3}{4}$ der im Stratum corneum anzutreffenden Lipide glandogener und zellulärer Herkunft. (18)

Die Vorstellungen von der Struktur des normalen Stratum corneum (s.c.), die bereits von Wolf (20) mit unterschiedlichen Methoden der Abrißtechnik und der Zelldifferenzierung erarbeitet wurden, konnten durch neuere Untersuchungen von Christophers (5), Kligman (3) und Mackenzie (14) weiter präzisiert werden.

Die scheibchenförmig abgeflachten Hornzellen haben einen polygonalen Rand und sind in säulenartiger Anordnung übereinander gestapelt. Dabei überlappen sich die Zellränder geringgradig.

Abb. 1:



In histologischen Schnitten konnten Christophers u.a. (4) (5) den Mechanismus der columnären Einordnung der in dem Hornzellerband sich peripher fortbewegenden Zellen darstellen. Die Säulenordnung ist in der Mäuseepidermis besonders präzise ausgebildet (13), und sie kann hier durch fluoreszierende Farbstoffe, die sich bevorzugt in Hornzellmembranen anreichern, gut dargestellt werden. (4)

Das Stratum corneum wirkt als eine "Barriere" (1) gegen uneingeschränkte Wasserabgabe nach außen, aber auch gegen das Eindringen exogener Stoffe nach innen in das lebende Epidermisepithel. Dabei haben die pars coniuncta und die pars disiuncta, das sogenannte Vorfeld, unterschiedliche Barrierefunktionen. (18)

Bei pathologischen Hautveränderungen zeigen sich im Stratum corneum deutliche architektonische Veränderungen. Seine hochorganisierte Säulenarchitektur geht verloren. An Orten mit erhöhter "turn-over"-Rate der Zellen, insbesondere an Handtellern und Fußsohlen, fehlt auch unter normalen Bedingungen die Säulenordnung (3). Sie fehlt völlig bei Hautkrankheiten wie der von Parakeratosen begleiteten Psoriasis, ferner bei Krankheiten mit erhöhtem transepidermalem Wasserverlust, bei Ichthyosis lamellaris und bei Lichenifikation (15). Auch unter experimentellen Bedingungen, z.B. Druck oder Kratzen mit einer Nadel (6) (9), zeigen sich

Veränderungen der säulenförmigen Keratinocytenanordnung.

In der vorliegenden Studie soll die Zelldarstellung im Fluoreszenzmikroskop reproduziert und die Veränderlichkeit der Säulenarchitektur unter einfachen, definierten Bedingungen am Versuchstier erprobt werden.

Dabei wird von der Vorstellung ausgegangen, daß eine deutliche Störung der Säulenstruktur des s.c. beim Versuchstier bereits durch physiko-chemische Traumatisierungen induziert wird, wie sie beim Menschen auch im täglichen Leben, vor allem am Arbeitsplatz, erwartet werden können. Die am Versuchstier zu beobachtenden Strukturveränderungen gestatten möglicherweise Rückschlüsse auf entsprechende Irritationswirkungen an der Humanhaut.

2. Eigene Untersuchungen

2.1 Material und Methode:

2.1.1 Versuchstiere:

Als Versuchstiere dienten Albinomäuse beiderlei Geschlechts von annähernd gleichem Gewicht. Vor Beginn der Untersuchungen wurden Gruppen zu je fünf oder zehn Versuchstieren gebildet, wobei darauf geachtet wurde, daß innerhalb einer jeden Gruppe Tiere gleichen Alters und Gewichts beisammen waren.

2.1.2 Irritation:

Die Irritation wurde mit einem Gemisch aus Alkohol (70 %) und Chloroform im Verhältnis 1:1 vorgenommen.

2.1.3 Prüfregion:

Als Prüfregion wurde die Außenseite der Ohren gewählt. Das s.c. des Mäuseohrs ist erfahrungsgemäß gut ausgeprägt und weist in der Regel eine exakte columnäre Schichtung auf. Wegen der relativ spärlichen Behaarung eignen sich die Ohren der Albinomäuse zudem besonders gut für die histologische Aufarbeitung.

2.1.4 Irritationsmodus:

Auf das rechte Ohr eines jeden Tieres wurden 0,2 ml des Lösungsgemisches mittels einer Tropfpipette geträufelt, ohne dabei das Ohr mit der Pipette zu berühren. Das linke Ohr blieb als Kontrollohr unbehandelt.

Bei den 5 Tieren der Tiergruppe 1 erfolgte an vier aufeinanderfolgenden Tagen täglich je zweimal eine Irritation. Insgesamt erhielten die Tiere acht Applikationen der Lösung. Die 10 Tiere der Tiergruppe 2 erhielten an acht aufeinanderfolgenden Tagen je 2 Applikationen, d.h. insgesamt 16 Anwendungen. Zwei Tage nach Abschluß der Behandlung wurden die Tiere mittels Äther-Inhalation getötet, und ihre Ohren für die weitere Untersuchung entnommen.

2.1.5 Histologische Aufarbeitung:

Die Gewebeproben der Tiergruppe 1 (G1) wurden in Paraplast verpackt und im Tiefkühler (-20°C) aufbewahrt. Bis zur Aufarbeitung des Untersuchungsmaterials - bis zu drei Monaten - blieb das Gewebe im Tiefkühler.

Die Gewebeproben der Tiergruppe 2 (G2) wurden nach Entnahme in Hank'scher Lösung (Firma Biokult) in sterile Ampullen eingeschmolzen. Diese wurden nach weiterer halbstündiger Lagerung im Tiefkühler in flüssigen Stickstoff versenkt. Auf diese Weise sollten die Zellen soweit wie möglich geschont werden. Die Verweildauer im flüssigen Stickstoff betrug längstens 4 Monate.

Die weitere Verarbeitung der Gewebestückchen beider Gruppen erfolgte auf gleiche Weise:

Die aus einem 20mm langen streifenförmigen Ausschnitt des Ohres bestehenden Gewebeproben wurden in Schweineleber eingebettet und mit einem Gefriermikrotom (Kryostat der Firma IEC, Modell CTC) geschnitten. Die Schnittdicke betrug 5 bis 6 nm. Von jedem Gewebestreifen wurden 50 Schnitte angefertigt, gefärbt und nach eigens

erarbeiteten Kriterien (s.u.) beurteilt.

2.1.5.1 Färbetechnik:

Als optimale Darstellungsmethode der Hornschicht erwies sich uns die erstmals von Christophers (7) angewendete Färbetechnik mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC), das bekanntlich auch zur Markierung von Immunglobulin verwendet wird. Es ist wasserlöslich, säurefest und zeigt gelbgrüne Fluoreszenz bei einem Maximum von 527 nm. Haarschaft, Haarfollikel, Epidermis, Zungenepithel, Ösophagus und ekkrine Schweißdrüsenausführungsgänge zeigen eine gute Tingierbarkeit. (7)

Da FITC sich mit den SH-Gruppen-haltigen Proteinen in der Hornschicht verbindet und Disulfidgruppen bildet, lassen sich mit dieser Substanz die Zellgrenzen der Hornschichtzellen besonders gut darstellen, desgleichen die Zellkerne und das Zytoplasma lebender Epidermiszellen.

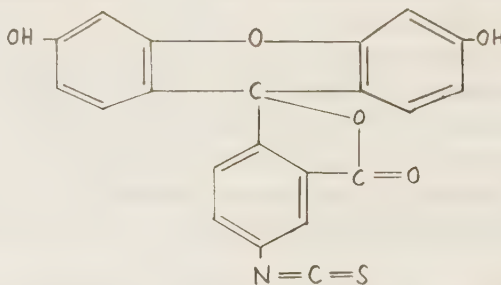


Abb. 2: Strukturformel des FITC

2.1.5.2 Zubereitung der Lösung:

Von dem als Trockensubstanz vorhandenen FITC (Merck

Darmstadt) wurde ein mg in 0,5 ml einnormaler NaOH gelöst und mit Aqua dest. auf 10 ml aufgefüllt. Der pH-Wert der Lösung lag zwischen 9,8 und 10.

Nach vorsichtiger Überschichtung des Gewebeschnittes und zweimaliger Einwirkung der FITC-Lösung wurde der Schnitt zweimal nacheinander je 2 Minuten lang mit Aqua dest. gespült und unter 1% Essigsäure eingedeckt.

1.5.3 Beurteilung:

Das Präparat wurde nach Anfertigung jeweils gleich unter dem Fluoreszenzmikroskop (Leitz Orthoplan) mit der Filterkombination 2 BG 12, 1 BG 8 (Erregerfilter) sowie K 530 (Sperrfilter) begutachtet. Photographische Aufnahmen wurden mit der Orthomat-Kamera (Leitz) gemacht. Dabei wurde ein Schwarz-Weiß-Film (Ilford HP 4, DIN 27-29) bei der Vergrößerung von PL 40- 0,25 verwendet.

2

Kriterien der Beurteilung:

Um eine möglichst gleichförmige und exakte qualitative, aber auch bestmögliche quantitative Auswertung der Reaktionsbefunde durchführen zu können, wurden die entnommenen Mäuseohren systematisch nach einheitlichen makroskopischen und mikroskopischen Kriterien beurteilt.

2.1

Makroskopische Kriterien für die Reizreaktion des behandelten Ohres und des unbehandelten Kontrollohres waren Rötung, Schwellung und Schuppung und zwar in 4 unterschiedlich schweren Reaktionsgraden:

(+) = schwache Rötung und allenfalls geringgra-

dige Schwellung;

+ = deutliche Rötung und Schwellung;

+ + = deutliche Rötung und Schwellung mit zarter Schuppung;

+ + + = starke Rötung und Schwellung mit ausgeprägter Schuppung.

Die zur histologischen Weiterverarbeitung von jedem Ohr entnommene Gewebsprobe wurde in bezug auf Höhe - identisch mit der Dicke des Ohres - und Länge mit der Schublehre gemessen.

2.2.2 Mikroskopische Kriterien:

Die von jedem Exzizat angefertigten histologischen Schnitte wurden auf die Zahl der Zellschichten des s.c. hin untersucht. Die Zählung erfolgte an mindestens zwei Stellen des Präparates. Zusätzlich wurde in der Versuchsgruppe 2 noch die Gesamtschichtdicke in nm gemessen. Diese Messung wurde mit dem Objektmikrometer (Leitz) bei der Vergrößerung von PL 40/0,25 durchgeführt.

Ferner wurde ein Index für die Art der Hornzellschichtung aufgestellt:

Merkmal I: Regelmäßige kohärente Schichtung des s.c.

Merkmal II: Spaltbildung zwischen den einzelnen Hornzellschichten

Merkmal III: Ablösung einzelner Hornzellschichten

Merkmal IV: Fetziges Ausfransen des s.c.

Merkmal V: Hyperkeratotische Areale

Merkmal VI: Störung der Säulenordnung des s.c.

Merkmal VII: Parakeratose

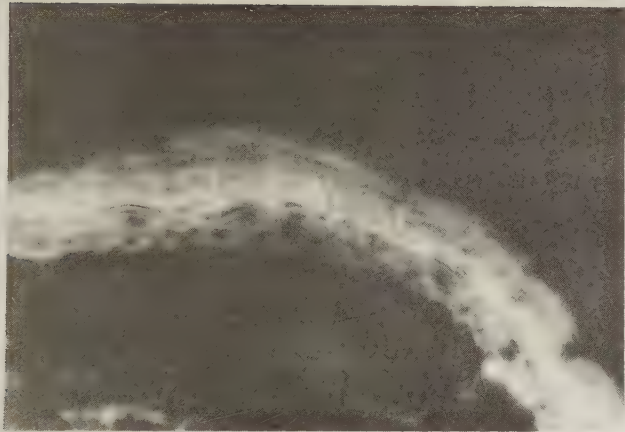


Abb. 3: Merkmal I: Columnäre Schichtung der Hornzellen
im Stratum corneum (M I) mit deutlich sicht-
barer Verzahnung der Zellränder.

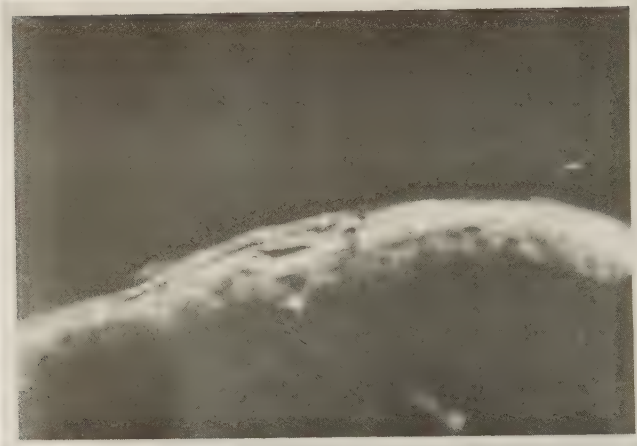


Abb. 4: Spaltbildung zwischen einzelnen Schichten des Stratum corneum (Merkmal II), die sich über mehrere Columnen erstreckt.

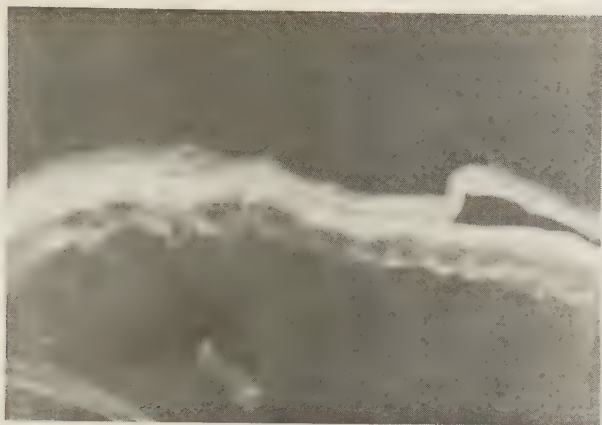
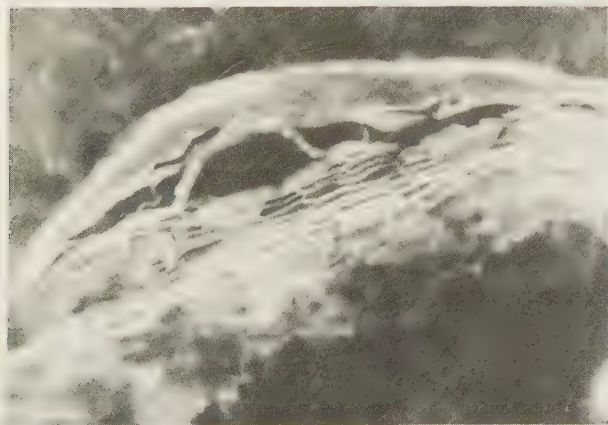


Abb. 5 a) Normalhaut

Abb. 5: Ablösung der Hornzellschichten, vorwiegend zwischen pars disiuncta und pars coniuncta (Merkmal III), a) an Normalhaut, b) an gereizter Haut beobachtet.

Abb. 5 b) gereizte Haut



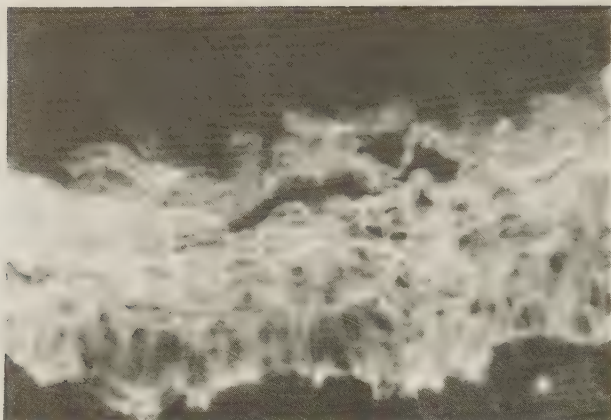


Abb. 6: Merkmal IV: Teilweise noch deutlich erkennbare columnäre Schichtung, fettig und zerfranst wirkendes s.c., wahrscheinlich artefiziell bedingt.



Abb. 7: Hyperkeratose (Merkmal V): Wesentlich höhere Anzahl von Hornzellschichten als im Normalfall (Abb. 3 u. 4); Auflockerung der Hornschichtstruktur (s.c. nach achttägiger Irritation, ebenfalls Abb. 8 u. 9).

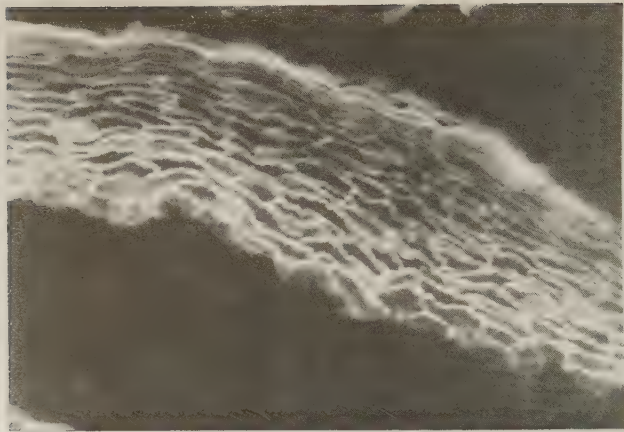
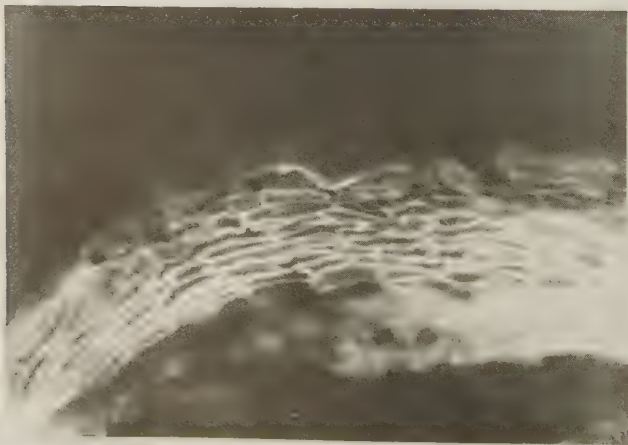


Abb. 8 a)

Abb. 8: Störung der Säulenarchitektur des s.c. (Merkmal VI): Völliges Fehlen der columnären Anordnung, unregelmäßig geformte Hornzellen (a); an manchen Stellen sogar sichtbarwerden der Interzellularspalten (b).

Abb. 8 b)



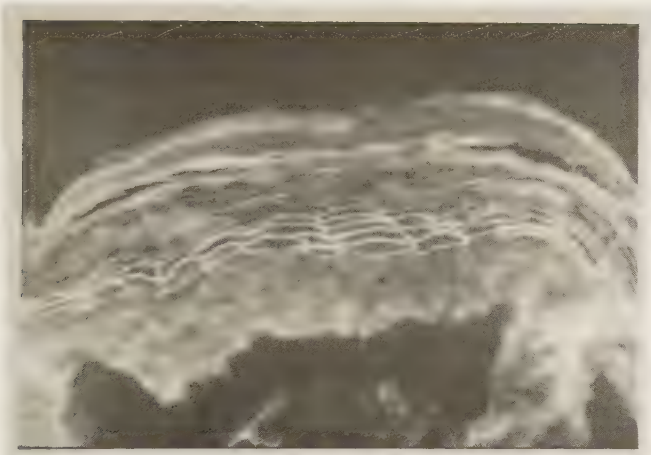


Abb. 9: Parakeratose (Merkmal VII): In den oberen Schichten des s.c. liegende Hornzellen, die noch Kerne aufweisen; daneben auch Spaltbildung, Hyperkeratose und geringgradige Störung der Columnärstruktur.

Die Merkmale I - VII (s. Abb. 3-9) waren bei der Durchsicht der in Vorversuchen hergestellten 800 Präparate in ihrer Häufigkeit und Regelmäßigkeit aufgefallen.

Mit zunehmender Verbesserung der Präparationstechnik trat Merkmal I häufiger, Merkmal IV seltener auf.

Aus den Einzelwerten der mit Schublehre und Objektmikrometer gemessenen Werte für die Dicke des Ohres und die Dicke des s.c. wurden für jedes Ohr die arithmetischen Mittelwerte gebildet.

Außerdem wurden von den je 50 Werten pro Ohr die reduzierte Spannweite festgelegt, die ein Maß für die Streubreite der gefundenen Werte darstellt. Sie umfaßt den Bereich, innerhalb dessen die Werte eines Parameters nach Streichung der beiden höchsten und niedrigsten Werte liegen.

3. Ergebnisse

Die bei Tiergruppe 1 und Gruppe 2 gefundenen Ergebnisse werden gesondert dargestellt und miteinander verglichen.

3.1 Versuchsgruppe 1:

3.1.1 Makroskopische Befunde:

Bereits nach viertägiger Irritation, d.h. nach insgesamt 8 Behandlungen mit der Irritationslösung, zeigte das behandelte Ohr bei allen 5 Tieren gegenüber dem unbehandelten eine schwache Rötung und bei zwei von fünf Tieren einen Dickenunterschied von 0,1 bzw. 0,05 mm (Tab. 1).

3.1.2 Mikroskopische Befunde:

Nach Auszählung der Hornzellschichten im vergleichbaren Bereich eines jeden Ohres wurden die Mittelwerte errechnet (arithmetisches Mittel). Dabei wurde durchwegs eine Zunahme der Zellschichten um 1 bis 2 Schichten festgestellt. Sie war am deutlichsten ausgeprägt bei den Tieren mit den bereits makroskopisch deutlichsten Veränderungen (Tab. 2).

Eine graphische Darstellung, in der die Anzahl der Hornzellschichten des irritierten und nicht irritierten s.c. nebeneinander aufgetragen sind, veranschaulicht die Reaktion des irritierten Gewebes (Abb. 10).

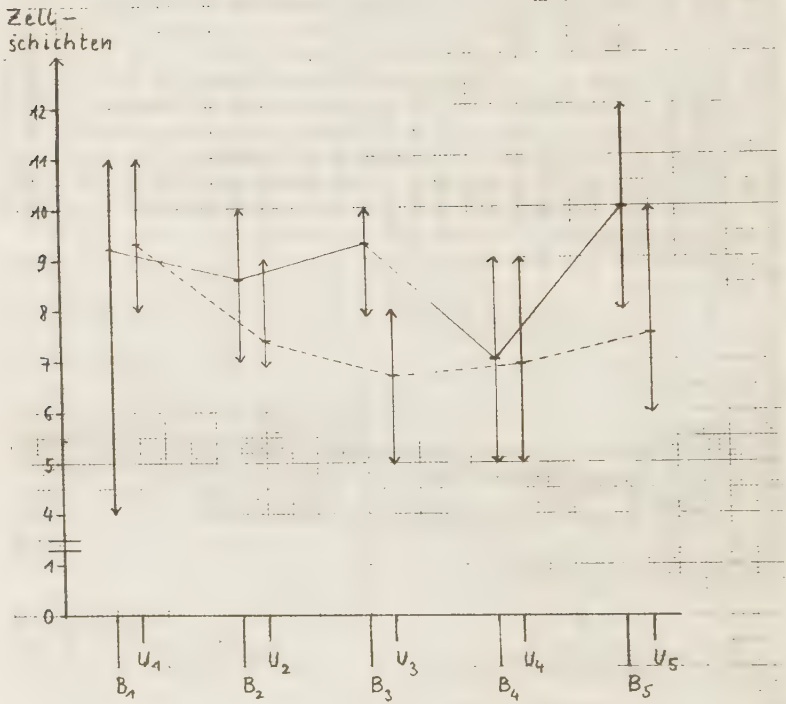
Tab. 1: Dicke des behandelten (B) und unbehandelten (U) Ohres der 5 Versuchstiere (VT) und makroskopische Reaktionsbefunde in Gruppe 1 ((+) = schwache Rötung und allenfalls geringe Schwellung des Ohres).

VT	Gewicht d. Tieres (g)	Ohr	Ohrdicke in mm	Präparatlänge in mm	Reaktion am Entnahmetag
1	33	B	0,25	7,2	(+)
		U	0,25	6,2	-
2	41	B	0,30	6,0	(+)
		U	0,30	7,0	-
3	40	B	0,35	6,4	(+)
		U	0,25	8,0	-
4	39,5	B	0,30	6,8	(+)
		U	0,30	7,2	-
5	39,5	B	0,30	7,0	(+)
		U	0,25	6,8	-

Tab. 2: Mittelwerte der Anzahl der Hornzellschichten und deren Streubreite am behandelten (B) und unbehandelten (U) Ohr bei Tiergruppe 1. Als Maxima und Minima der reduzierten Spannweite werden die Extremwerte nach Streichung der 2 höchsten und niedrigsten Werte aufgeführt.

VT	Ohr	Maximum der reduzierten Spannweite	Mittelwert der Zellschichtzahlen	Minimum der reduzierten Spannweite
1	B	11	9,26	4
	U	11	9,36	8
2	B	10	8,61	7
	U	9	7,44	7
3	B	10	9,34	8
	U	8	6,72	5
4	B	9	7,42	5
	U	9	7,40	5
5	B	12	9,98	8
	U	10	7,51	6

Abb. 10: Zahl der Hornschichtlagen am behandelten (B) und unbehandelten (U) Ohr der 5 Versuchstiere (VT) der Gruppe 1 mit Darstellung der Mittelwerte von B (—) und U (---), sowie der Streubreite aller Werte als reduzierte Spannweiten ($\updownarrow$).



Bei der Betrachtung der Histomorphologie zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Prüfregionen. Im Gegensatz zu dem meist regelmäßig bzw. columnär ausgebildeten Hornschichtband der Kontrollohren (M I) zeigte das behandelte s.c. bei allen 5 Tieren der Gruppe 1 den Verlust einer regelmäßigen kohärenten Schichtung. Zwischen den einzelnen Lagen des s.c. kam es zur Spaltbildung (M II) und schichtweiser Ablösung (M III).

Mit Hilfe des Wilcoxon-Tests (Normalverteilung der Zufallsvariablen für kleine Stichprobenumfänge) wurden diese Merkmalsunterschiede als signifikant ermittelt.

Beim Wilcoxon-Test wird die Verteilung der Prüfgröße T (kleinere Rangsumme aus den verglichenen Stichproben) bei gegebenem Stichprobenumfang und gegebenem Signifikanzniveau (hier $\alpha = 0,05 = 5\%$ Niveau) ermittelt.

Das Kriterium für die statistische Entscheidung für Signifikanz lautet:

$$T = T_{\alpha ; n}$$

T = kleinere der beiden Rangsummen aus der Stichprobe

α = Irrtumswahrscheinlichkeit

n = Anzahl der Stichproben

Auch eine fetzige Ausfransung des s.c. (M IV) fand sich häufig an behandelten Proben, jedoch ohne nachweisbare Signifikanz.

Die bei Gruppe 1 gefundenen Veränderungen sind in Tab. 3 wiedergegeben.

Die Häufigkeitsverteilung dieser Merkmale in Form einfacher Histogramme (Abb. 11) läßt die Tendenz der statistischen Berechnung bereits erkennen, jedoch ohne Signifikanzanspruch. Dabei erscheint die "Säulenhöhe" im Histogramm als Maß für die Häufigkeit eines histologischen Merkmals aus dem Versuch.

Tab. 3: Häufigkeit und Verteilung der Merkmale I - IV an behandelten (B) und unbehandelten (U) Prüfregionen der Gruppe 1, nach Befundung von jeweils 45 bzw. 50 Schnitten einer Prüfregion.

M I = regelmäßige kohärente Schichtung

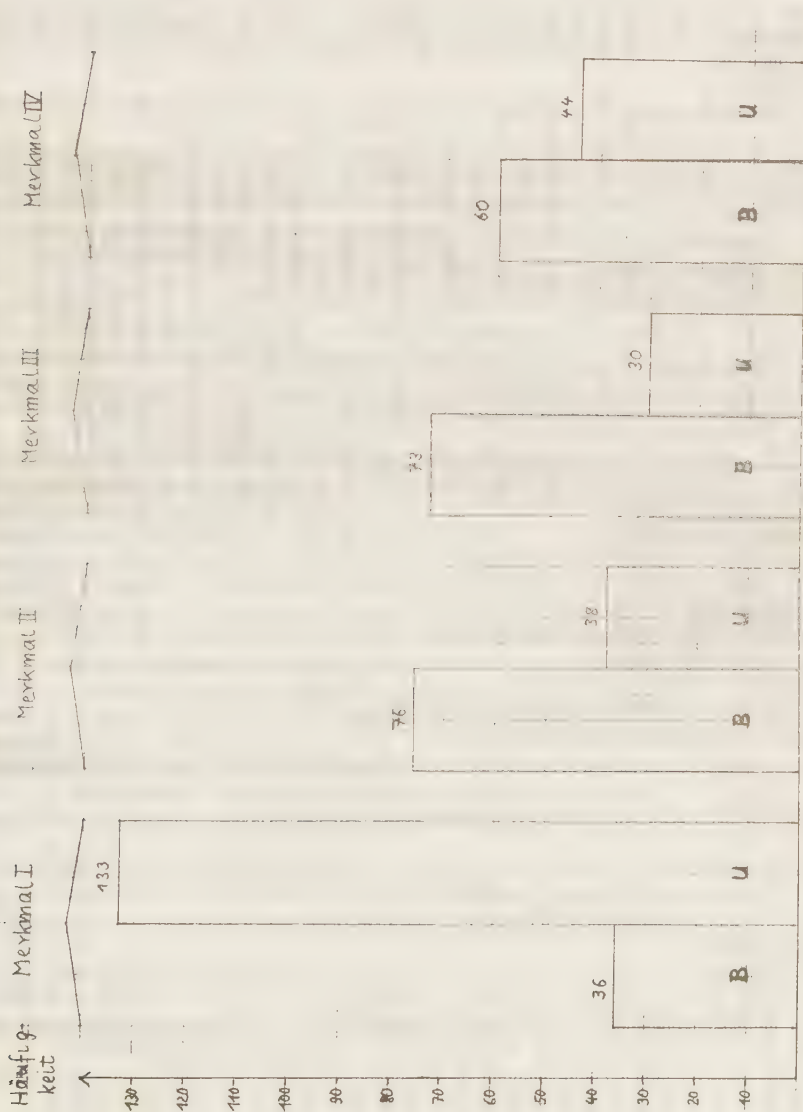
M II = Spaltbildung zwischen den Schichten
des s.c.

M III = Ablösung einzelner Schichten des s.c.

M IV = fetzige Ausfransung des s.c.

Tier Nr.	Uhr	M I	M II	M III	M IV	Anzahl der Präparate
1	B	8	8	17	17	50
	U	36	5	0	9	50
2	B	17	17	8	8	50
	U	22	10	12	6	50
3	B	0	25	18	7	50
	U	31	7	4	8	50
4	B	6	15	16	13	50
	U	30	11	4	5	50
5	B	5	11	14	15	45
	U	14	5	10	16	45
Ins- ge- samt	B	36	76	73	60	245
	U	133	38	30	44	245

Abb. 11: Histogrammdarstellung der Häufigkeitsverteilung der beurteilten Merkmale I-IV am behandelten (B) und unbehandelten (U) Gewebe in Gruppe 1.



3.2 Versuchsgruppe 2 (G 2):

In Versuchsgruppe 2 war an 10 Mäusen acht Tage lang täglich je zweimal das rechte Ohr einer Irritationsbehandlung unterworfen worden.

3.2.1 Makroskopische Befunde:

Am irritierten Ohr kam es bei allen Tieren der Gruppe 2 zwischen dem vierten und fünften Behandlungstag, d.h. nach acht bis zehn Behandlungen zu einer Reaktion: am Entnahmetag, zwei Tage nach Abschluß der Behandlung, bestand makroskopisch eine deutliche Rötung, Schwellung und Schuppung, besonders stark bei zwei von zehn Tieren (VT 2 und 5 in Tab. 4). Die behandelten Ohren waren zum Zeitpunkt der Entnahme durchwegs dicker als die unbehandelten Kontrollohren, und zwar betrugen die Dickenmeßwerte mindestens das Doppelte, in einem Fall (VT 2) sogar mehr als das Vierfache des Kontrollohres (Tab. 4).

3.2.2 Mikroskopische Befunde:

Bei der mikroskopischen Analyse traten die Veränderungen des behandelten gegenüber dem unbehandelten Gewebe ebenfalls deutlich hervor. Die Zahl der Zellschichten am irritierten s.c. lag im Mittel um 3,8 Schichten über dem Kontrollwert. Bei einem Versuchstier (VT 2) mit einer besonders ausgeprägten Reaktion betrug die Zunahme maximal sogar 11 Zellschichten. Es fiel auf, daß die Streubreite dieser Werte beim gereizten Gewebe ebenfalls größer war als bei den Kontrollen. Auf mögliche Ursachen dafür wird später eingegangen.

Tab. 4: Makroskopische Befunde am behandelten (B) und unbehandelten (U) Ohr in Versuchsgruppe 2.

VT	Gewicht d. Tieres (g)	Ohr	Ohrdicke (mm)	Präparatlänge (mm)
1	22,5	B	0,7	9,2
		U	0,3	9,8
2	26,5	B	1,4	10,0
		U	0,3	10,0
3	23,0	B	0,7	10,0
		U	0,3	10,0
4	22,0	B	0,6	12,0
		U	0,25	9,2
5	25,0	B	0,85	10,4
		U	0,3	10,6
6	23,5	B	1,0	12,0
		U	0,3	9,0
7	25,0	B	0,6	10,0
		U	0,25	10,0
8	22,5	B	0,6	11,4
		U	0,3	10,0
9	25,0	B	0,5	8,0
		U	0,25	10,0
10	20,5	B	0,5	11,8
		U	0,25	9,2

Fortsetzung Tab. 4:

Legende: + Deutliche Rötung und Schwellung
 ++ Deutliche Rötung und Schwellung mit
 zarter Schuppung
 +++ Deutliche Rötung und Schwellung mit
 ausgeprägter Schuppung

VT	Ohr	Erste Reaktion nach --tägiger Behandlung	Reaktion am Entnahmetag
1	B	10	+
	U	-	-
2	B	8	+++
	U	-	-
3	B	8	+
	U	-	-
4	B	9	++
	U	-	-
5	B	8	+++
	U	-	-
6	B	8	++
	U	-	-
7	B	10	+
	U	-	-
8	B	8	++
	U	-	-
9	B	9	++
	U	-	-
10	B	10	+
	U	-	-

Ein Vergleich der Hornschicht (HS) - Dicke der irri-
tierten und nicht irrierten Areale ergab noch ein-
drucksvollere Unterschiede. Während an der nicht irri-
tierten Haut eine HS-Dicke von 15 nm im Mittel gemessen
wurde, zeigten irrierte Regionen durchwegs mindestens
doppelt so hohe Werte, in einem Fall (VT 2) sogar 73 nm.

Die Hornschichtdickenbefunde sprechen in bezug auf
die jeweilige Zahl der Hornschichtlagen offenbar für
eine Größenzunahme der einzelnen Hornzellen im behan-
delten s.c. (Abb. 12 und Abb. 13). Einzelmessungen der
Zellgröße wurden allerdings nicht systematisch durchge-
führt (Tab. 4).

Abb. 12: Darstellung der Anzahl der Hornschichtlagen am behandelten (B) und unbehandelten (U) Ohr in Gruppe 2: Mittelwerte der Ergebnisse für B (—) und U(---). 1cm = 1 Schicht.

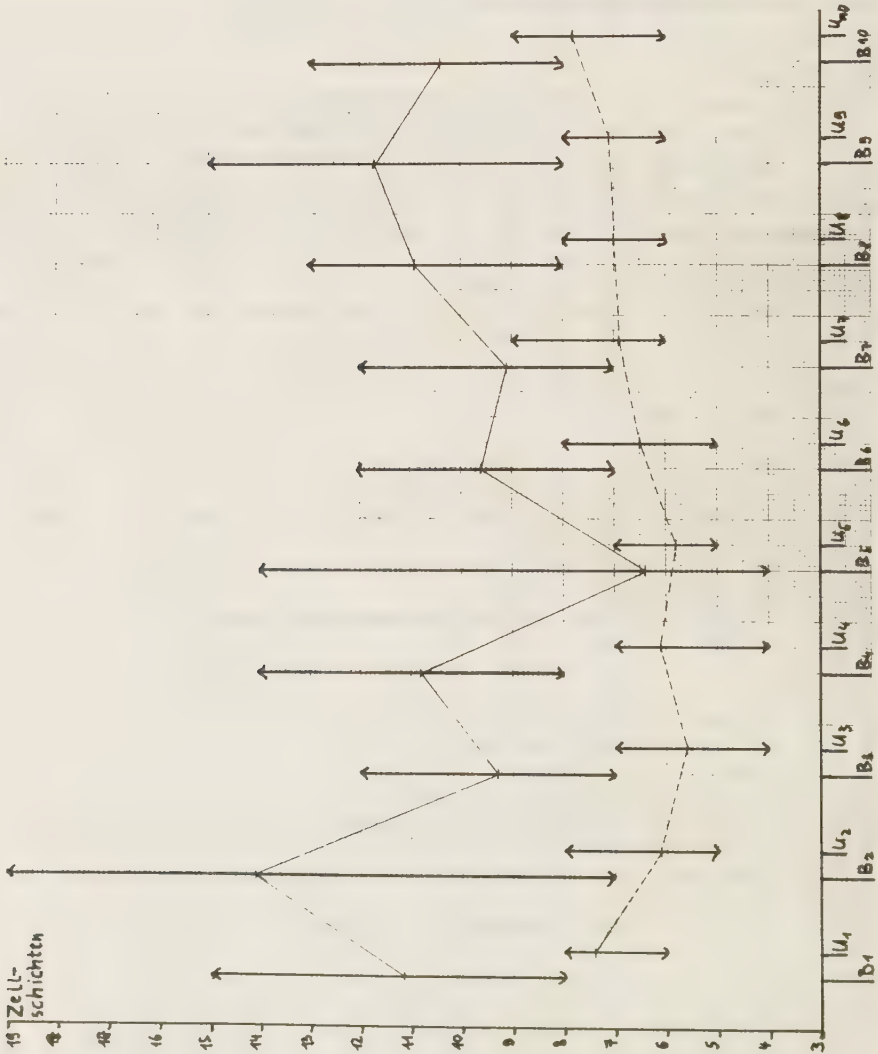
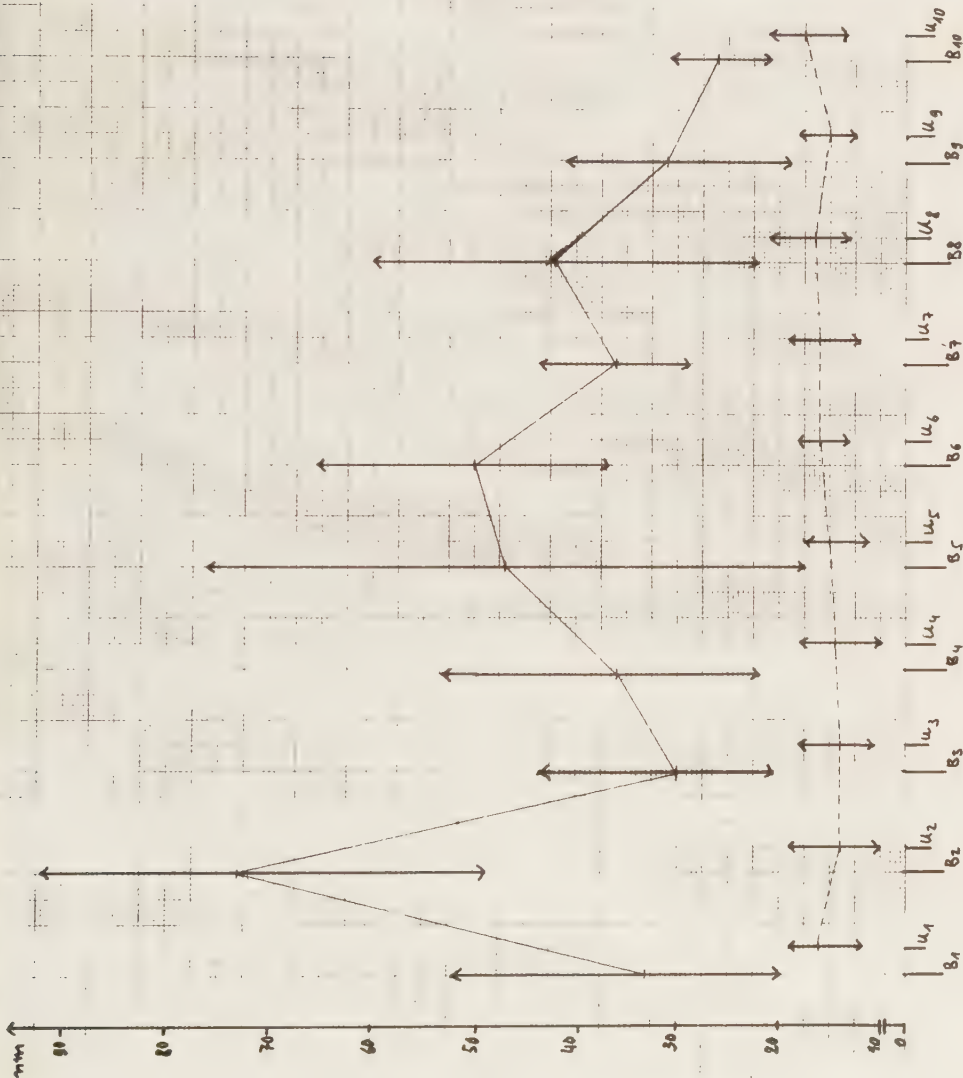


Abb. 13: Hornschichtdicke in nm am behandelten (B) und unbehandelten (U) Ohr in Gruppe 2. Mittelwerte für B (—) und U (---) und reduzierte Spannweiten ($\updownarrow$). 2cm = 10 nm.



Tab. 4: Mikroskopische Meßdaten an behandelten (B) und unbehandelten (U) Ohren in Gruppe 2; Mittelwerte (MW) der Anzahl der Zellschichten und der Hornschichtdicke in nm mit Maxima (Max.) und Minima (Min.) der reduzierten Spannweite.

VT	Ohr	Zellschichtzahl			Hornschichtdicke		
		Max.	MW	Min.	Max.	MW	Min.
1	B	15	11,15	8	52,38	33,16	20,37
	U	8	7,41	6	18,43	16,14	14,55
2	B	19	14,15	7	92,34	72,73	49,47
	U	8	6,11	5	17,85	14,53	11,16
3	B	12	9,35	7	44,13	29,74	21,34
	U	7	5,61	4	16,68	14,26	11,64
4	B	14	10,83	8	54,32	35,69	24,25
	U	7	6,06	4	16,68	14,59	11,16
5	B	14	6,91	4	73,72	46,67	20,37
	U	7	5,83	5	20,37	14,83	12,03
6	B	12	9,61	7	66,25	49,14	36,86
	U	8	6,48	5	18,04	16,41	14,26
7	B	12	9,15	7	46,56	36,48	29,10
	U	9	6,93	6	19,20	16,06	12,61
8	B	13	10,87	8	60,14	42,37	22,31
	U	8	6,98	6	20,85	17,47	13,58
9	B	15	11,72	8	40,74	31,16	18,82
	U	8	7,09	6	17,95	15,11	13,09
10	B	13	10,41	8	30,07	26,13	21,34
	U	9	7,83	6	20,86	17,55	14,74

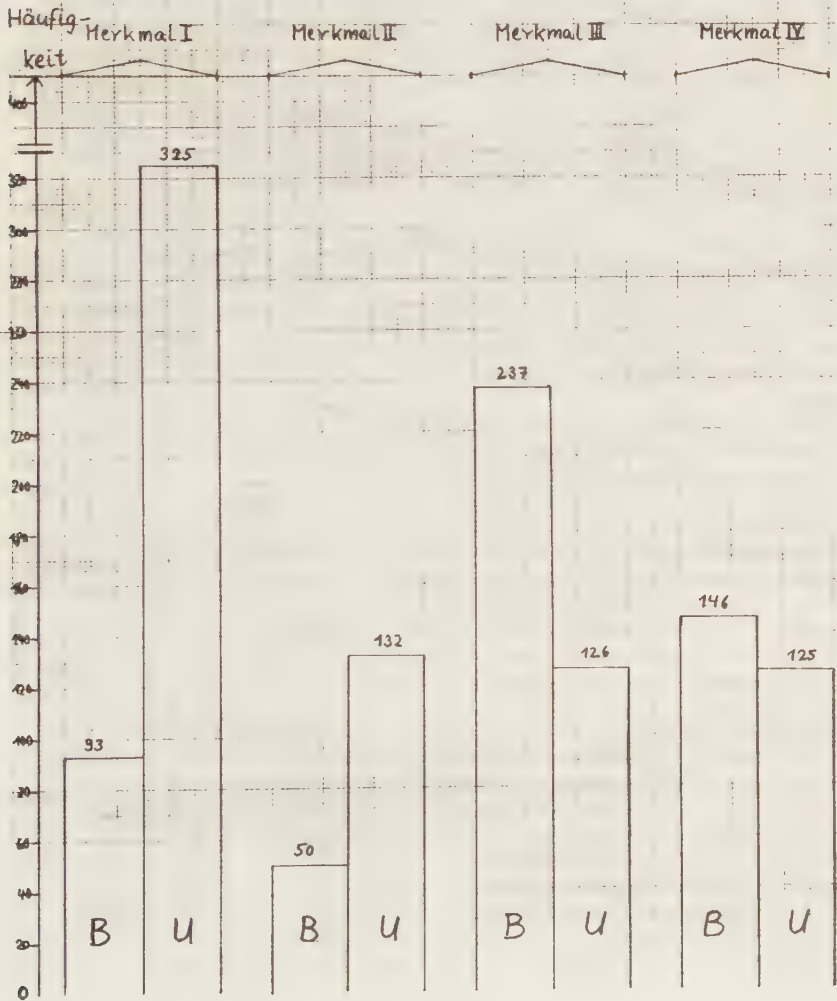
In der Versuchsgruppe 2 wurden nach insgesamt 16 Behandlungen an der irritierten Hornschicht histomorphologische Veränderungen gefunden, die bei Versuchsgruppe 1 nicht aufgetreten waren:

- hyperkeratotische Areale (Merkmal V),
 - Verlust der für das s.c. typischen Säulenordnung (Merkmal VI),
 - parakeratotische Hornzellen (Merkmal VII).
- (Tab. 5)

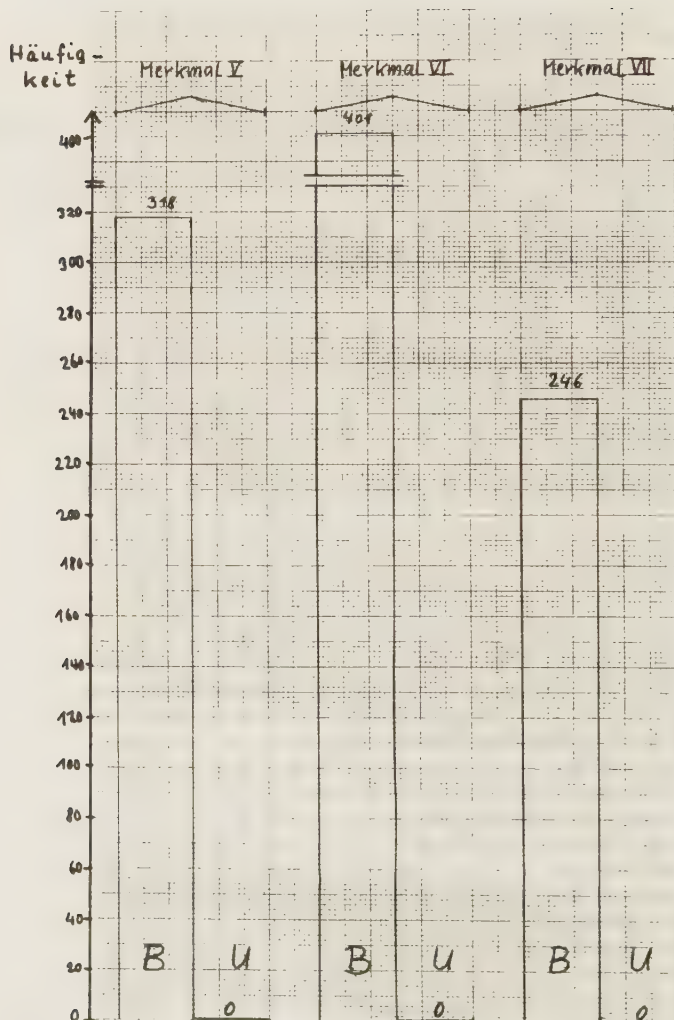
Diese Merkmale waren statistisch hoch signifikant (Wilcoxon-Test). Der Verlust der regelmäßigen, kohärenten Schichtung der irritierten Hornschicht erwies sich als statistisch hochsignifikant. Das typische Merkmal I des normalen s.c. ließ sich in Gruppe 2 am behandelten Ohr bei 2 von 10 Versuchstieren (VT 2 und 6) überhaupt nicht nachweisen. Spaltbildung zwischen den Schichten (M II) trat in Gruppe 2 beim behandelten Gewebe nicht so häufig auf wie beim unbehandelten. Im Wilcoxon-Test erwies sich dieses Merkmal als für Gruppe 2 nicht signifikant. Eine fetzige Ausfransung des s.c. (M IV) beobachteten wir in Gruppe 2 bei behandelten Ohren und Kontrollohren etwa gleich häufig. Das stützt die Annahme, daß diese Hornschichtmodifizierung vom Niveau der Verarbeitungstechnik abhängt.

Obwohl eine graphische Darstellung der einzelnen Merkmalshäufigkeiten in Histogrammen, wie schon erwähnt, keine Aussage über die Signifikanz der Befunde macht, kann man den Trend der Ergebnisse in Gruppe 2 hierdurch doch gut erkennbar aufzeigen (Abb. 14).

Abb. 14: Darstellung im Histogramm der Merkmale (M)
I - VII in ihrer Häufigkeitsverteilung an
behandelten (B) und unbehandelten (U) Ohren
in Gruppe 2.



Fortsetzung Abb. 14:



3.3 Vergleich der Ergebnisse von Versuchsgruppe 1 und 2:

In beiden Versuchsgruppen wurde die gleiche Irritationsmethode - Beträufeln des rechten Ohres mit einem Chloroform-Äthanol-Gemisch - zweimal täglich angewendet, bei G 1 über vier Tage, bei G 2 über acht Tage. In Gruppe 2 stellte sich eine gegenüber Gruppe 1 schon makroskopisch heftigere Reaktion des Gewebes ein: mit deutlicher Rötung und Schwellung des behandelten Ohres, mindestens auf das Zweifache der Dicke des Kontrollohres, und mit zum Teil ausgeprägter Schuppung.

Die mikroskopischen Analysen ergaben eine Zunahme der Anzahl der Hornzellschichten beim irritierten s.c., wobei die acht Tage lang irritierte Hornschicht der Gruppe 2 im Mittel um 4 Zellagen zunahm, die nur vier Tage lang gereizte der Gruppe 1 um eine Schicht.

Die Veränderung der Hornschichtstruktur durch die Irritationsbehandlung ließ sich ebenfalls in der Versuchsgruppe 2 in höherem Maße nachweisen: Aufhebung der columnären Anordnung der Hornzellen, Hyper- und Parakeratosen in Arealen der irritierten Hornschicht waren Merkmale, die allein in Versuchsgruppe 2 vorkamen.

Eine Spaltbildung zwischen den Schichten des s.c. (M 2) erwies sich jedoch als nicht signifikant für die Hornschichtirritation. Dieses Merkmal fand sich in Versuchsgruppe 2 an ungereiztem Gewebe häufiger als am irritierten, während in Versuchsgruppe 1 eine Spaltbildung häufiger beim gereizten Gewebe zu beobachten war.

4. Diskussion

4.1 Kritik der Methoden:

Die FITC-Färbung erscheint zur Darstellung der Hornzellstruktur gut geeignet, da sie vornehmlich die Zellmembran hervorhebt. Mit der NaOH-Schwellungstechnik, wie sie 1964 von Kligman und Christophers (3) entwickelt wurde, gelingt eine derart klare Darstellung der Zellgrenzen offenbar nicht. Abgesehen davon kommt es bei der NaOH-Schwellungstechnik zu höhergradiger Desintegration des Gewebes und starker Abblassung der Färbung. Auch bei der FITC-Methode erweist sich die rasche Abschwächung der Fluoreszenz als Nachteil. Jedenfalls ist eine längerfristige Konservierung der FITC-Präparate ohne erheblichen Qualitätsverlust nicht möglich. Für die Darstellung der strukturellen Hornschichtveränderungen und ihre histomorphologische Analytik erwies sich die FITC-Methode jedoch als durchaus brauchbar.

Kritik der Fehlerquellen der Versuchsanordnung

Das Mausohr stellt ein für experimentelle Irritationsstudien nahezu optimales Prüffeld dar. Es ist relativ leicht zugänglich, seine Behaarung spärlich und die Hornschicht gut ausgeprägt.

Während der Versuchsperiode waren die Tiere nicht fixiert. Sie konnten sich frei bewegen und somit - möglicherweise - auch an den Ohren kratzen, zumal die Testlösung durchaus Juckreiz verursachen kann. Kratzeffekte wurden indessen bei keinem Tier der Gruppe 1 oder 2 beobachtet.

Sie hätten immerhin eine zusätzliche Irritation dar-

stellen können. Inwieweit derartige mechanische Alltagsreize den Versuchsablauf tatsächlich beeinflußt haben, bleibt offen.

Daß die unterschiedlich lange Aufbewahrung des Untersuchungsmaterials - von der Entnahme bis zur Verarbeitung vergingen maximal 3 Monate - eine Veränderung der Morphe, insbesondere durch Auskristallisieren von Zellwasser, herbeigeführt hat, ist zwar nicht völlig auszuschließen, erscheint jedoch nach vergleichenden Analysen an frisch verarbeiteten Präparateserien von untergeordneter Bedeutung. Auch kann eine mechanische Alteration des Gewebes bei der histologischen Aufarbeitung durch Schneiden und Färben nicht ganz ausgeschlossen werden, doch dürfte diese Fehlerquelle an dem relativ stabilen Material des Stratum corneum keine nennenswerte Rolle spielen.

In Vorversuchen an der Haut von Meerschweinchen und Maus konnten die Versuchsbedingungen erarbeitet und vor allem auch die Verarbeitungstechniken erprobt werden. Dabei ergaben sich keine feingeweblichen Unterschiede zwischen frischen und gelagerten Präparaten. Allerdings wurde im Laufe der Untersuchungen bei der Konservierung eine zunehmende Schonung des Gewebes erreicht. Die Gewebestückchen wurden später nicht mehr in Paraplast verpackt, sondern in mit Hank'scher Lösung gefüllte Glasampullen eingeschmolzen und in flüssigem Stickstoff versenkt. Auf diese Weise werden auch empfindliche Gewebeproben zur Zellzüchtung, beispielsweise Melanomzellen, schonend aufbewahrt.

Die mikroskopische Beurteilung der Präparate unterliegt naturgemäß immer einer gewissen subjektiven Fehlermöglichkeit. Sie könnte insbesondere bei Versuchs-

gruppe 1 eine Rolle gespielt haben, denn hier waren die Veränderungen des irritierten Gewebes weniger augenfällig als in den Gewebeproben der längerfristig irritierten Versuchsgruppe 2.

4.2 Erörterung der Befunde:

Zweimal täglich wiederholte Beträufelung des Mäuseohres mit dem Äthanol-Chloroformgemisch führte bereits in weniger als 4 Tagen zu makroskopischen Veränderungen, nämlich: Rötung, Schwellung und Schuppung. Bei der histologischen Beurteilung der irritationsbedingten Veränderungen des Substrats fanden sich als charakteristische Merkmale selten noch eine regelmäßige, kohärente Schichtung (M 1 Abb.3) zuweilen Spaltbildung zwischen den Schichten des s.c. (M 2 Abb.4), häufig eine Ablösung einzelner Schichten dess.c. (M 3, Abb.5) und ein fetzig zerfranstes s.c. (M 4 Abb.6).

In Versuchsgruppe 1 wiesen 54 % der Präparate an der unbehandelten Hornschicht eine regelmäßige kohärente Schichtung auf. Im irritierten Gewebe fand sich dieses Merkmal dagegen nur in 15 % der Schnitte. In Versuchsgruppe 2 hatten 18 % der irritierten und 65 % der normalen Hornschicht eine regelmäßige Schichtung. Zusätzlich fanden sich in als regelmäßige Merkmale in der Versuchsgruppe 2 am irritierten s.c. eine Hyperkeratose (M 5 Abb.7), eine Störung der Säulenordnung (M 6, Abb.8) und Parakeratose (M 7, Abb.9). Die Säulenordnung war hier bei 80 % der Hornschichtpräparate von irritierter Haut gestört. Hyperkeratose fand sich in 73 %, Parakeratose in 49 % der Präparate.

Parakeratose war bereits bei den Vorversuchen am irritierten Meerschweinchenohr häufiger beobachtet worden. Da aber beim Meerschweinchen die Beurteilung

der Säulenordnung vergleichsweise schwierig erschien, wurden für die eigentlichen Versuchsreihen Mäuse herangezogen.

Die bei Gruppe 2 zusätzlich aufgetretenen Merkmale, nämlich Störung der Säulenordnung, Hyper- und Parakeratose, fanden sich in den histologischen Präparaten aller 10 Excisate von irritierten Ohren, wenn auch in unterschiedlicher Häufigkeit. Sie traten immer in Kombinationen auf. Zwar war es auch nach viertägiger Reizapplikation in Gruppe 1 zu Veränderungen des Gewebebildes gekommen, aber die chemische Reizung über sechs bis acht Tage in Gruppe 2 führte zu den histologisch eindeutig klassifizierbaren Veränderungen.

Die Merkmale 2 (Spaltbildung zwischen den Schichten) und 3 (Ablösung einzelner Schichten des s.c.) stellen geringgradige Abweichungen von der regelmäßigen und kohärenten Schichtung der Hornzellen dar. Merkmal 4 (fetziges, zerfranstes s.c.) muß zumindest teilweise als durch mangelnde Verarbeitungstechnik bedingt angesehen werden, da diese Merkmale mit Verbesserung der histologischen Technik an Häufigkeit abnahm.

Die Veränderungen in der Hornschichtstruktur, wie sie in Versuchsgruppe 2 beobachtet wurden, erinnern durchaus an pathologische Veränderungen der Humanhaut bei Neurodermitis mit Lichenifikation oder Psoriasis. Zwar kennt man diese Hautkrankheiten bei kleinen Versuchstieren nicht doch findet die Ähnlichkeit des Hornschichtbildes bei diesen Hautkrankheiten mit den oben beschriebenen Irritationseffekten (M 5, M 6, M 7) unsere besondere Aufmerksamkeit.

Als weitere Parameter konnten in den Versuchsgruppen 1 und 2 außerdem die Anzahl der Zellschichten des

s.c., in Versuchsgruppe 2 auch die Schichtdicke des s.c. mittels Objektmikrometer bestimmt werden. Innerhalb des von uns gewählten Versuchszeitraumes zeigt die Veränderung der Zellschichtzahl - als Reizantwort - eine klare Abhängigkeit von der Reizdauer, d.h. von der Anzahl der Reizexpositionen. Allgemein konnte eine Zunahme der Hornzellschichten im irritierten s.c. festgestellt werden. Die Mittelwerte bei Versuchsgruppe 1 ergaben einen Anstieg um durchschnittlich eine Zellschicht (s. Tab.2).

Bei Versuchsgruppe 2 betrug die mittlere Zunahme der Zellschichten sogar 3,8 Schichten gegenüber dem ungereizten s.c. Im einzelnen zeigten sich Unterschiede bis zu 11 Zellschichten. Eine Zunahme der Anzahl der Hornzellschichten proportional zur Reizdauer kann für den hier gewählten Zeitraum als gesichert gelten. Mackenzie (14) beobachtete an einer ähnlichen Versuchsreihe, jedoch nach mechanischer Reizung durch Friktion des Mäuseohrs mit einer Bürste bis zu 35 Tagen, daß nach längerer Reizdauer die Zunahme der Hornzellschichten konstant bleibt, und zwar etwa nach dem achten Behandlungstag. Mackenzie fand in dieser Versuchsreihe, die auch Veränderungen in den lebenden Epidermisschichten berücksichtigte, ferner eine Verdickung und Zellzunahme im Stratum spinosum et granulosum. Die vorliegende Arbeit beschränkt sich auf die Untersuchung der Hornschicht, doch kann ohne weiteres auf eine Veränderung der tiefer gelegenen Epidermisschichten geschlossen werden.

In Versuchsgruppe 2 wurden auch Messungen der Hornschichtdicke durchgeführt. Dabei zeigte sich eine deutliche Zunahme der Hornschichtdicke an der irritierten Haut. Als formale Ursache für die Dickenzunahme kommen

mehrere Möglichkeiten in Betracht:

- 1) Dickenzuwachs auf Grund der zahlenmäßigen Zunahme der Hornschichtlagen.
- 2) Geringere Kohäsion der Hornzellen durch Behandlung mit der Irritationslösung und Verbreiterung der Inter-cellularspalten (vergleiche Abb.8).
- 3) Vergrößerung der einzelnen Hornzellen des irritierten s.c. im Vergleich zur normalen Hornzelle.

Nach Menton und Eisen (15) findet sich elektronen-optisch eine Vergrößerung der einzelnen Hornzellen auch in Psoriasisherden, deren Ähnlichkeit mit den von uns experimentell erzeugten Hornschichtveränderungen bereits erwähnt wurde. Die Größe der einzelnen Hornzellen wurde von uns allerdings nicht statistisch relevant ausgemessen. Aus Abb.8-10 ergeben sich jedoch Hinweise auf solche Veränderungen.

Auf der Grundlage der oben geschilderten Untersuchungen lassen sich gut quantitative Analysen der epidermalen Reizbeantwortung durchführen.

Auch die therapeutische Beeinflußbarkeit der durch den definierten Reiz erzeugten Hautveränderungen läßt sich an Hand dieses Versuchsmodells darstellen.

5. Zusammenfassung

Die nach wiederholter Applikation eines physiko-chemischen Reizes an der Hornschicht des Mäuseohrs makroskopisch und mikroskopisch beobachteten Strukturveränderungen waren Gegenstand der vorliegenden Untersuchungen.

Dank der guten Tingierbarkeit lassen sich mit Fluorescein-Isothiocyanat die Hornzellmembranen optimal darstellen. Die Hautirritation durch wiederholtes Aufträufeln eines 1:1 Gemisches aus Chloroform und 70 % Alkohol an vier bis acht Tagen bewirkte eine Dickenzunahme der Hornschicht, eine Auflockerung der Hornschichtstruktur bis hin zum völligen Verlust der columnären Anordnung der Hornzellen. Außerdem trat Hyper- und Parakeratose auf.

Der Grad der Strukturveränderungen nahm zu mit der Dauer der Irritationsbehandlung. Während bei der vier Tage lang behandelten Versuchsgruppe 1 lediglich Strukturauflockerungen der Hornschicht beobachtet wurden, insbesondere Spaltbildung zwischen den Schichten und Ablösung einzelner Hornzellschichten, kam es bei der acht Tage lang behandelten Versuchsgruppe 2 zum völligen Verlust der säulenartigen Hornzellschichtung, zu ausgeprägter Hyperkeratose und zum Auftreten von Parakeratosezellen.

In den letzten drei Strukturmerkmalen zeigt sich die Antwort des gereizten Gewebes in statistisch signifikanter Weise. Die Dickenzunahme der Hornschicht läßt sich allein durch die Vermehrung von Hornzelllagen nicht befriedigend erklären. Als weitere Ursachen kommen eine Verbreiterung der Intercellularspalten und eine Vergrößerung der einzelnen Hornzellen in Betracht.

Die vorgelegten Untersuchungen bestätigen die gute Eignung des Mauseohrs für experimentelle Irritationsstudien an der Hautoberfläche. Sie erscheinen ausbaufähig als Modell nicht nur für eine quantitative Analyse der epidermalen Reizbeantwortung, sondern auch für die Objektivierung der therapeutischen Beeinflussbarkeit der durch definierte Irritation erzeugten Epidermis- bzw. Hornschichtveränderungen.

6. Literatur

- 1) Blank, I.H.: Cutaneous barriers, J.Inv. Derm. 45, 249-256 (1965).
- 2) Brody, I.: The Ultrastructure of the Horny Cell Layer in normal and psoriatic Epidermis as revealed by Electronmicroscopy. J. Inv. Derm. 39, 519 (1962).
- 3) Christophers, E., Kligman, A.M.: Visualisation of the Cell Layers of the Stratum Corneum: J.Inv. Derm. 98: 407-409 (1964).
- 4) Christophers, E.: Eine neue Methode zur Darstellung des stratum corneum. Arch. klin. exp. Derm. 237: 717-721 (1970).
- 5) Christophers, E.: Cellular Architecture of the Stratum Corneum. J. Inv. Derm. 46: 165-169 (1971).
- 6) Christophers, E.: The Architecture of the Stratum Corneum after Wounding. J. Inv. Derm. 57: 241-246 (1971).
- 7) Christophers, E., Braun-Falco, O.: Fluorescein - Isothio - Cyanate as a Stain for Keratinizing Epithelia. Arch. dermat. Forsch. 241: 199-209 (1971).
- 8) Christophers, E.: Die epidermale Columnärstruktur. Z. Zellforsch. 114: 441-450 (1971).
- 9) Epstein, W.L., Maibach, H.J.: Cell Renewal in Human Epidermis. Arch. Dermat. 92: 462-468 (1965).
- 10) Haitinger, M.: Fluoreszenz - Mikroskopie, 2.Auflage, Akademie-Verlag Leipzig (1960).
- 11) Keddle, F., Sakai, D.: Morphology of the Horn Cells of the Superficial Stratum Corneum: Cell Membrane and Melanin Granules. J. Inv. Derm. 44: 135-136 (1965).
- 12) Mackenzie, I.A.: Ordered Structure of the Stratum Corneum of Mammalian Skin. Nature 222: 881-882 (1969).

- 13) Mackenzie, I.A.: Relationship between Mitosis and the ordered Structure of the Stratum Corneum in Mouse Epidermis. *Nature* 226: 653-655 (1970).
- 14) Mackenzie, I.A.: The Effects of Frictional Stimulation on Mouse Ear Epidermis. *J. Inv. Derm.* 63: 194-198 (1974).
- 15) Menton, D.N., Eisen, A.Z.: Structural Organisation of the Stratum Corneum in Certain Scaling Disorders of the Skin. *J. Inv. Derm.* 57: 295-307 (1971).
- 16) Menton, D.N., Eisen, A.Z.: Structure and Organisation of Mammalian Stratum Corneum. *J. Ultrastruct. Res.* 35 (1971).
- 17) Schwarz, E.: Was weiß man von der epidermalen Verhornung? *Zsch. Haut-Geschl.Krkh.* 42, 20: 791-806 (1967).
- 18) Spier, H.W., Szakall, Fischer, Klaschka: Belastungen der Haut, ihre Gesetzmäßigkeiten und ihre Folgen. *Derm.Wochenschr.* 142: 1073-1084 (1960).
- 19) Wildnauer, R.H., Bothwell, J.W., Douglass, A.: Stratum Corneum Biomechanical Properties. *J. Inv. Derm.* 56: 72-78 (1971).
- 20) Wolf, J.: Über die Herstellung mikroskopischer Präparate der Oberflächen verschiedener Objekte mit Hilfe der Adhäsionsmethode. *Z. wiss. Mikr.* 56, 181-201 (1939).

D a n k s a g u n g

Für die Überlassung des Dissertationsthemas danke ich Herrn Professor Klaschka, der mich in fachlichen Fragen freundlich unterstützt hat.

Besonderer Dank gilt Herrn Professor Fuchs für seine beratende Hilfe in allen Fragen der medizinisch-statistischen Methodik.

Auch den Medizinisch-technischen Assistentinnen des Dermatologischen Labors möchte ich meinen Dank für die freundliche und hilfsbereite Zusammenarbeit aussprechen.

Lebenslauf

Ich wurde am 22.5. 1947 in Pöcking/ Obb. geboren. als erstes Kind meiner Eltern Lore, geb. Kolter , und Felix Rothenfußer, beide Lehrer in Aufkirchen. Dort besuchte ich vom September 1953 bis Juli 1958 die Volksschule. Am Realgymnasium Starnberg , das ich vom September 1958 bis Juli 1967 besuchte, machte ich Juli 1967 das Abitur.

Im Oktober 1967 erhielt ich die Zulassung zum Medizinstudium an der Ludwig-Maximilian-Universität München. Dort legte ich im Herbst 1968 das Vorphy - sikum und im Frühjahr 1970 das Physikum ab. Im Oktober 1971 setzte ich das Medizinstudium an der Freien Universität Berlin fort. Hier begann ich im Frühjahr 1972 mit der vorliegenden Dissertation. Im Februar 1974 beendete ich das Medizinstudium mit dem Staatsexamen.

Seither war ich vom 1.6. bis 30.9. 1974 im Klinikum Steglitz als Medizinalassistentin in der internistischen Klinik tätig, vom 15.10. 1974 bis 15.2. 1975 war ich Medizinalassistentin am Städtischen Urban Krankenhaus. Im Mai 1975 war ich einen Monat in der Dermatologischen Klinik, seit 1.6. 1975 bin ich in der Neurologischen Klinik des Klinikum Steglitz als Medizinalassistentin tätig.

Johanna Rothenfußer

